

■原 著■

二型性葉緑体の微細構造に注目した C₄ 植物トウモロコシと その類縁種の系統学的研究

鈴木季直^{1,2,3} 福田千春¹ 河田直美¹ 永井 慎¹ 岡島 崇¹

A Phylogenic Study on the Relationship between C₄ Plant Maize
and Its Wild Relatives with Special Reference to
Fine Structures of Dimorphic Chloroplasts

Suechika Suzuki^{1,2,3}, Chiharu Fukuda¹, Naomi Kawada¹,
Makoto Nagai¹ and Tskashi Okajima¹

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: To provide information on the phylogenic relationship between maize and its wild relatives, fine structures of dimorphic chloroplasts in those plant leaves were observed by electron microscopy. Examined plants were a cultivated maize, two kinds of annual teosinte, *Zea luxurians* (Ames 21876 and PI441931), two kinds of perennial teosinte, *Zea diploperennis* and *Zea perennis*, a tripsacum, *Tripsacum dactyloides*, and Job's tears, *Coix lacryma-jobi*. Bundle sheath chloroplasts of all plants were agranal, although the rudimentary grana piled up with a few thylakoids were frequently found in cultivated maize and annual teosinte, *Z. luxurians*. They always contained a large number of starch grains. Cell walls of bundle sheath cells were well constructed with a suberized lamella in all plants, and thickness of cell walls was the largest in tripsacum. In mesophyll chloroplasts of all plants examined, no difference was found in the internal membrane system. However, the starch content of mesophyll chloroplasts was conspicuously different among the plants examined. In cultivated maize and annual teosinte, mesophyll chloroplasts had uncommonly a few small starch grains, whereas those of perennial teosinte, *Z. perennis*, and tripsacum contained relatively numerous large starch grains. These results indicate that the starch content of mesophyll chloroplasts is a valid index to estimate the phylogenic relationships among maize and its wild relatives, and that annual teosinte is closely related to cultivated maize. Structural features of dimorphic chloroplasts of Job's tears closely resemble those of tripsacum, suggesting a phylogenic relationship.

Keywords: C₄ plants, maize, phylogenic relationship, dimorphic chloroplasts, starch grains

序論

サトウキビやトウモロコシなど、光合成における C₄ 経路の脱炭酸酵素が NADP-リンゴ酸酵素 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-malic enzyme) である典型的な NADP-ME 型の C₄ 植物の緑葉では、維管束鞘細胞とその周囲の葉肉細胞は形態的に異なる二種の葉緑体 (二型性葉緑体)

を含むことが知られている^{1,2)}。維管束鞘細胞の葉緑体は発達したグラナを欠き多量の大きなデンプン粒を持つのに対して、葉肉細胞の葉緑体は良く発達したグラナを持つがデンプン粒は殆どないか、あっても小さく、量もわずかである。さらに、発生過程における明瞭な維管束鞘葉緑体内のグラナの退化も



Fig.1. Plants examined by electron microscopy. A. Cultivated maize. B. *Tripsacum* grown in experimental field of Kanagawa University. C. Annual teosinte *Zea luxurians* (Ames21876) grown from the seed in a greenhouse. D. Job's tears *Coix lacryma-jobi* grown wild.

含めて二型性葉緑体の構造分化は、 C_4 植物の機能分化や系統分化と相関している可能性が示されており³⁻⁵⁾、二型性葉緑体の微細構造を比較することで植物間の類縁関係を考察することができると考えられる。この観点から、本研究では、典型的な C_4 植物である栽培種トウモロコシ、その祖先野生種とされるテオシント4種(1年生2種、多年生2種)、野生類縁種のトリプサカム、およびトリプサカムに近縁と思われるジュズダマ⁶⁾の緑葉細胞と二型性葉緑体の微細構造を観察して比較検討した。

材料と方法

実験材料としたトウモロコシとその類縁種は、市販の栽培種トウモロコシ *Zea mays* L.、2種の1年生テオシント *Zea luxurians* (Durieu and Asherson) Bird (Ames21876, PI441933)、2種の多年生テオシント *Zea diploperennis* Iltis, Doebley and Guzman (PI441931) と *Zea perennis* (Hitchcock) Reeves and Mangelsdorf (Ames21869)、トリプサカム *Tripsacum dactyloides* L. である(図1A-C)。トリプサカムに近い日本の植物とされるジュズダマ *Coix lacryma-jobi* L. も参照植物として観察した(図1D)。テオシントの種子とトリプサカムの株は京都大学農学部の植物生殖質研究施設から提供されたものを用いた。シャーレの底に敷いた脱脂綿に水を含ませてその上に種子を播き、20°Cの培養器中に置いた。発芽後鉢に植えかえ、25°Cの温室内で育てた。約2ヶ月後の第二葉または第三葉の先端部から葉片を採集した(図1C)。株分けされたトリプサカムを神奈川県湘南平塚キャンパス内の実験圃場に植え、

成長した植物(図1B)の緑葉を採集した。参照植物のジュズダマは神奈川県湘南平塚キャンパス近隣の川端に自生しており(図1D)、この緑葉を採集した。

緑葉から $1 \times 3 \text{ mm}^2$ の小片を細切し、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.2)で希釈した6% グルタルアルデヒド液に浸漬し、4°Cで24時間前固定した。同リン酸緩衝液と蒸留水で洗浄した後、蒸留水で希釈した2% 四酸化オスミウム液により4°Cで24時間後固定した。その後、試料をアセトン系列で脱水し、Epoxy樹脂に包埋して熱重合させた。ウルトラミクローム(Reichert Ultracut-N)で樹脂包埋試料から厚さおよそ70 nmの超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色して透過型電子顕微鏡(JEOL JEM2000EX)で観察した。

葉緑体、特に葉肉細胞葉緑体内のデンプン量の違いを定量的に比較するために、細胞や細胞内構造容積の変化を評価できるモンタージュ法⁷⁻¹⁰⁾を適用した。撮影された葉肉細胞葉緑体の電子顕微鏡写真(デンプン含有率計測対象写真)を対象にし、葉緑体の断面積およびその中に含まれるデンプン粒の断面積を画像処理ソフトImage Jで測定し、葉緑体断面積当たりのデンプン粒断面積の割合(%)を求め、植物間での差異を比較検討した。

結果

トウモロコシの緑葉には既に良く知られているような典型的な二型性葉緑体が観察され、葉肉細胞の葉緑体は、 C_3 植物と同様に、グラナとインターグラナチラコイドからなる内膜系を含んでおり(Fig. 2A)、

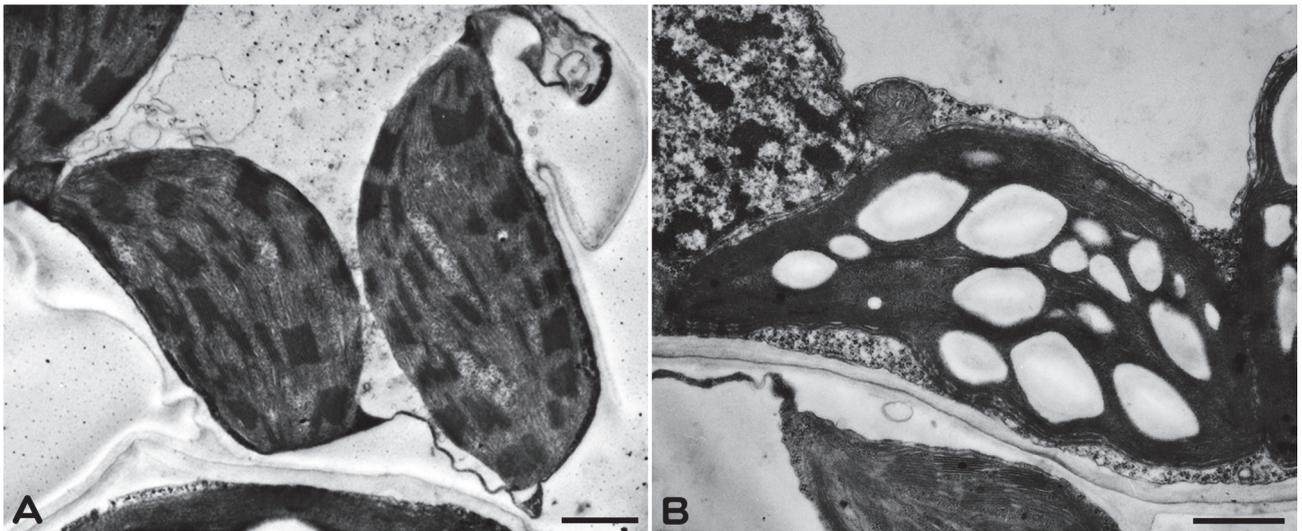


Fig.2. Dimorphic chloroplasts in the green leaves of maize. A. Chloroplasts of mesophyll cells, containing well developed grana and no starch grain. B. Chloroplasts of bundle sheath cells, showing agranal structures and a numerous number of large starch grains. Scale bars, 1 μ m.

一方、維管束を取り囲む維管束鞘細胞の葉緑体は C_3 植物の葉緑体より大きく、その内膜系においてはグラナを欠いていた (Fig. 2B)。一般的に二型性葉緑体は内膜系におけるグラナの有無により特徴づけられているが、典型的な C_4 植物では葉緑体に含まれるデンプン粒の有無または多少によっても区別されている。本観察でも、実際に、維管束鞘細胞葉緑体には多数の大きなデンプン粒が含まれていたが、葉肉細胞葉緑体には全く含まれていないか、あっても小さく、数も数個以内であった。デンプン含有率計測対象写真内で観察された全葉肉細胞葉緑体 124 個中、少量ながらもデンプン粒が含まれていたものは 9 個、およそ 7.3%であった。

トウモロコシの祖先野生種とされる 4 種のテオシントの緑葉に含まれる二型性葉緑体の微細構造を観察した (Fig. 3)。一年生テオシントは *Z. luxurians* (Ames21876) および *Z. luxurians* (PI441933) の 2 種を観察した。Fig.3A と Fig.3B は、それぞれ、*Z. luxurians* (Ames21876) の典型的な葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体を示している。維管束鞘細胞葉緑体は大きなレンズ型で、グラナを欠く内膜系を持つ特徴はトウモロコシのそれと同じであり、また、多数の大きなデンプン粒を含んでいた。一方、葉肉細胞に含まれる葉緑体の内膜系は非常に良く発達した多数のグラナとインターグラナチラコイドからなり、トウモロコシのそれと特徴は一致した。Fig.3A の葉緑体のようにストロマ内に全くデンプン粒を示さないか、観察されても、それらは、トウモロコシの葉肉細胞葉緑体と同様に、極めて小さく数も僅かであった。同じ一年生テオシントの *Z. luxurians*

(PI441933) の二型性葉緑体もこれらと同じ微細構造特徴を示した。*Z. luxurians* (Ames21876) では、デンプン含有率計測対象写真で観察された全葉肉細胞葉緑体 99 個中、デンプン粒が含まれていたものは 19 個、およそ 19.2%であり、この率はトウモロコシより高かった。

多年生テオシントは二倍体の *Z. diploperennis* (PI441931) と四倍体の *Z. perennis* (Ames21869) の 2 種を観察した。Fig.3C と Fig.3D は、それぞれ、*Z. diploperennis* の典型的な葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体を示している。維管束鞘細胞葉緑体は、トウモロコシのそれと同様に、内膜系は並走する単一のチラコイドからなり、グラナを欠いていた。チラコイド間のストロマには多数の大きなデンプン粒が含まれていた。一方、葉肉細胞葉緑体がグラナとインターグラナチラコイドからなる内膜系を含むことはトウモロコシのそれと同様であったが、ストロマ内には、少数ながらも、かなりの頻度でデンプン粒が観察された。デンプン含有率計測対象写真で観察された全葉肉細胞葉緑体 71 個中、デンプン粒が含まれていたものは 33 個、およそ 46.5%であり、トウモロコシや一年生のテオシントよりも高頻度で葉緑体がデンプン粒を含むことが示唆された。

Fig.3E と Fig.3F は、それぞれ、四倍体テオシント *Z. perennis* の典型的な葉肉細胞葉緑体と維管束鞘細胞葉緑体を示している。前者がグラナを含み、後者はそれを欠くという内膜系の特徴はトウモロコシおよび他のテオシントと同じであった。維管束細胞葉緑体のストロマに多量のデンプンが含まれていることも同じであったが、トウモロコシや一年生テオシント

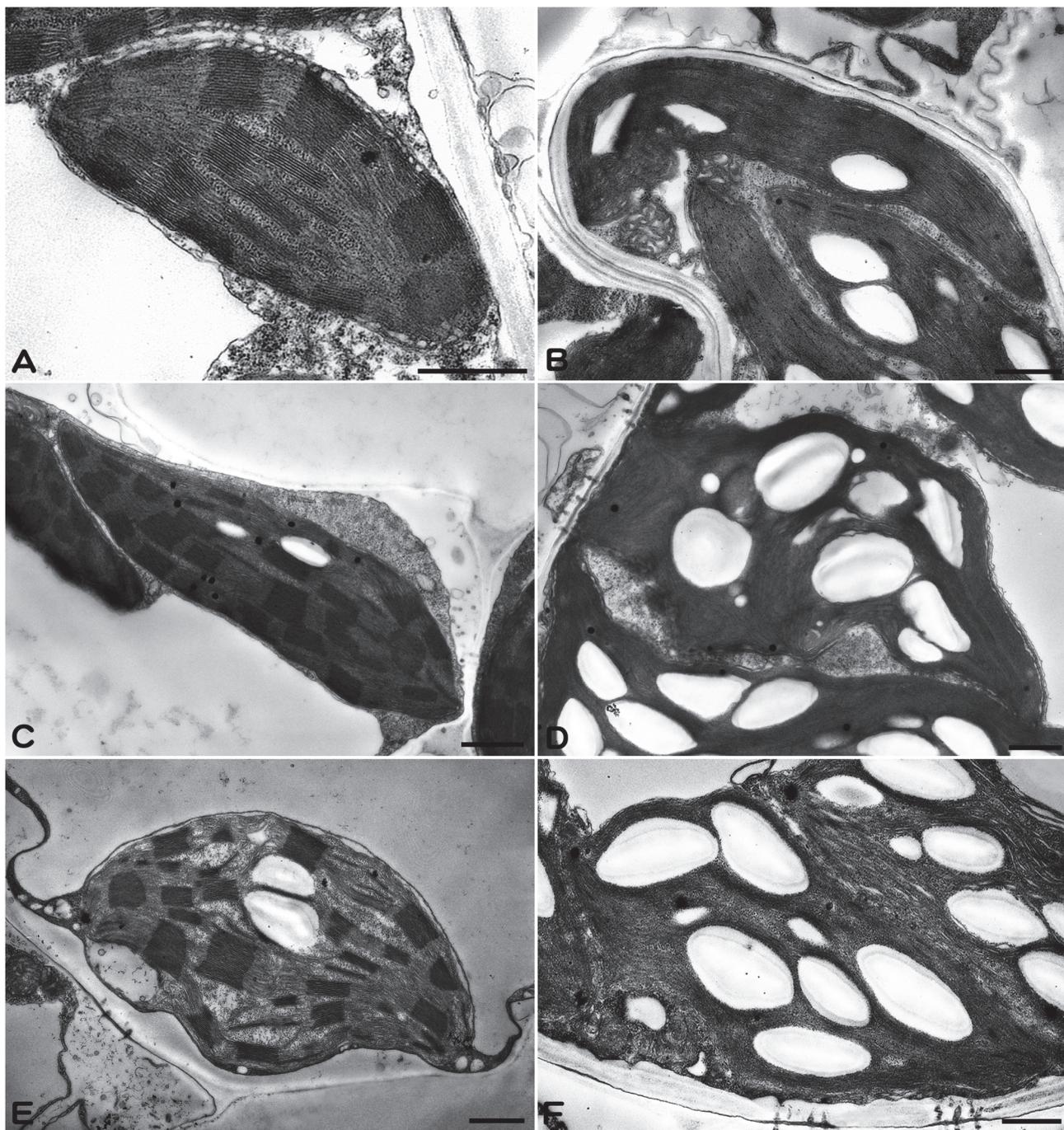


Fig.3. Dimorphic chloroplasts in the green leaves of various teosintes. A and B. Chloroplasts of mesophyll cells (A) and bundle sheath cells (B) in an annual teosinte *Z. luxurians* (Ames21876). C and D. Chloroplasts of mesophyll cells (C) and bundle sheath cells (D) in a perennial diploid teosinte *Z. diploperennis*. E and F. Chloroplasts of mesophyll cells (E) and bundle sheath cells (F) in a perennial tetraploid teosinte *Z. perennis*. Note starch grains found in mesophyll cell chloroplasts. Scale bars, 1 μ m.

トとは異なり、葉肉細胞葉緑体にはかなりデンプン粒が出現する傾向があった。それは *Z. diploperennis* と同様であったが、出現頻度はそれより低く、デンプン含有率計測対象写真で観察された全葉肉細胞葉緑体 127 個中、デンプン粒が含まれていたものは 41 個、およそ 32.3%であった。

トウモロコシ類縁の野生種と思われるトリブサクムの緑葉に含まれる二型性葉緑体の微細構造を観察

した (Fig.4A, B)。トリブサクムも C_4 経路をもつ植物であり⁹⁾、維管束鞘細胞内の葉緑体は、グラナを欠いた内膜系とチラコイド間に多量の大きなデンプン粒を含んでおり、トウモロコシやテオシントと同じ特徴を示した (Fig.4A)。一方、葉肉細胞の葉緑体は、内膜系ではトウモロコシやテオシントと違いは認められなかったが、ストロマ内に含まれるデンプン粒の状況は顕著に異なっていた (Fig.4B)。葉肉細胞の

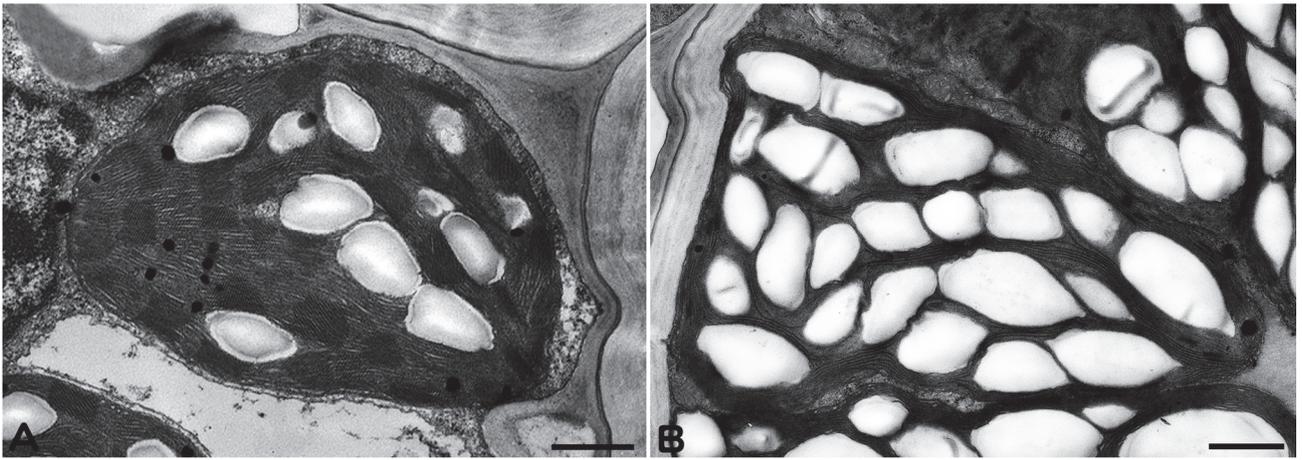


Fig. 4. Dimorphic chloroplasts in the green leaves of tripsacum. A. Chloroplasts of mesophyll cells, containing well developed grana and a numerous number of relatively large starch grains. B. Chloroplasts of bundle sheath cells, showing agranal structures and a numerous number of large starch grains. Scale bars, 1 μ m.

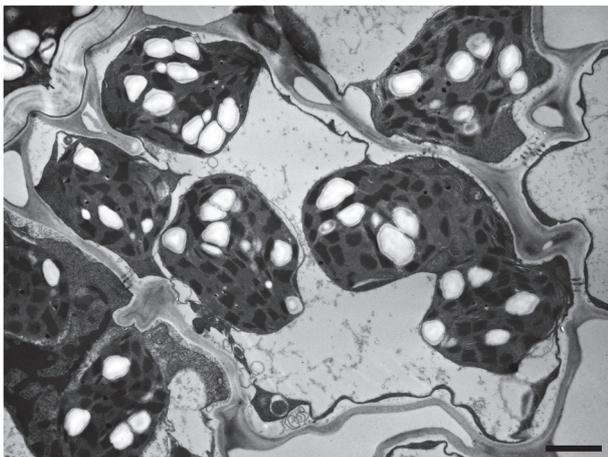


Fig. 5. Mesophyll cells of tripsacum leaves, showing all chloroplasts contain a numerous number of relatively large starch grains. Scale bar, 1 μ m.

葉緑体内にはかなり大きなデンプン粒が多数含まれており、そのデンプン粒に関する微細構造的所見は NADP-ME 型以外の C₄ 植物¹¹⁾ や典型的な C₃ 植物の

葉肉細胞内に見られる葉緑体に似ていた。デンプン含有率計測対象写真で観察されたトリプサクムの全葉肉細胞葉緑体 106 個中、デンプン粒が含まれていたものは 86 個、およそ 81.1% であり、トウモロコシや一年生のテオシントよりも高頻度で葉緑体にデンプン粒が含まれることが示唆された。これを反映し、時には、葉肉細胞内に含まれる全ての葉緑体に多数の大きなデンプン粒が含まれていた (Fig. 5)。

トリプサクムに近縁と思われるジュズダマの緑葉に含まれる二型性葉緑体の微細構造を観察した (Fig. 6A, B)。維管束鞘細胞の葉緑体はグラナを欠いた内膜系を持ち、多数の大きなデンプン粒を含み、観察された他のすべての植物のそれとよく似ていた (Fig. 6A)。葉肉細胞のグラナを持つ葉緑体は、トリプサクムの葉肉細胞葉緑体とよく似ており多数の大きなデンプン粒を含んでいた (Fig. 6B)。デンプン含有率計測対象写真で観察されたジュズダマの全葉肉細胞葉緑体 77 個中、デンプン粒が含まれていたもの

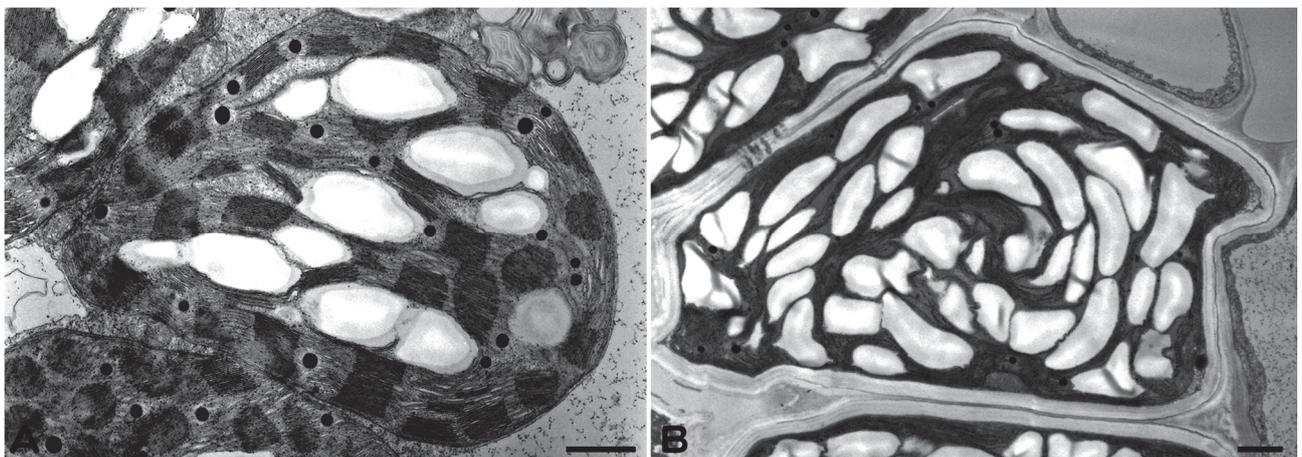


Fig. 6. Dimorphic chloroplasts in the green leaves of Job's tears. A. Chloroplasts of mesophyll cells, containing well developed grana and a numerous number of relatively large starch grains. B. Chloroplasts of bundle sheath cells, showing agranal structures and a numerous number of large starch grains. Scale bars, 1 μ m.

は 69 個、およそ 89.6% で、殆どの葉緑体がデンプン粒を含むことを示した。

葉肉細胞葉緑体内のデンプン量の違いを定量的に比較するために、撮影された電子顕微鏡像を無作為に抽出し、デジタル画像に変換し、葉緑体および葉緑体内デンプン粒の断面積を測定した。いずれの植物でも、観察された葉肉細胞（各植物、 $n=20$ ）には 3 - 4 個の葉緑体が含まれており、葉緑体が細胞に占める割合は 25 - 30% でほぼ同じ値を示した。一方、澱粉粒が葉緑体に占める割合（%）は植物毎に異なっていた。Fig.7 はその結果をまとめたものである。以下、平均値とその標準偏差（ $n=60$ ）で表すと、トウモロコシは $0.08 \pm 0.26\%$ で最も低く、次いで一年生テオシントが $0.25 \pm 0.58\%$ 、四倍体の多年生テオシントが $1.54 \pm 2.48\%$ 、二倍体の多年生テオシントが $1.68 \pm 2.95\%$ と順次高くなり、トリプサカムは $7.29 \pm 5.75\%$ で最も高かった。なお、ジュズダマは $6.27 \pm 5.67\%$ でトリプサカムに近い割合を示した。

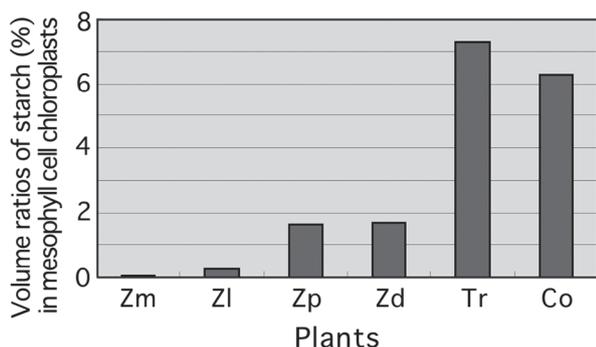


Fig.7. Fractional volume (%) of starch grains to the whole mesophyll chloroplast, from the digital image analysis of electron micrographs. Zm: *Z. mays*, Zl: *Z. luxurians*, Zp: *Z. perennis*, Zd: *Z. diploperennis*, Tr: *T. dactyloides*, Co: *C. lacryma-job*.

討論

典型的な NADP-ME 型 C_4 植物の緑葉に見られる葉緑体の構造分化が機能分化や系統分化と相関している可能性に基づき、栽培種トウモロコシとその類縁種の二型性葉緑体の微細構造を観察して比較検討した。その結果、葉緑体の内膜系では種間の違いは認められなかったが、葉肉細胞葉緑体のデンプン粒出現状況に顕著な違いが生じていることが認められた。デンプン粒が各葉肉細胞葉緑体に占める割合はトウモロコシで最も低く、次いで、一年生テオシント、多年生テオシント、トリプサカムの順に高くなっていった。

従来、トウモロコシの起源については多くの研究がなされており、テオシントがトウモロコシの直接の先祖であるとするテオシント説^{12,13}や絶滅した野

生種とテオシントやトリプサカムとの交雑により進化したとする三部説¹⁴など諸説あったが、アイソザイムや葉緑体 DNA の系統解析^{15,16}から、近年ではトウモロコシに最も近い系統は一群のテオシントであると考えられており、トウモロコシの起源にトリプサカムが関与する可能性も否定されているようである¹⁷。本研究でなされた葉肉細胞葉緑体のデンプン粒出現の比較において、トウモロコシは一年生テオシントと最も良く似ており、トリプサカムやジュズダマとは顕著に異なっていたことはトウモロコシの起源に関する前述の解釈とよく一致する。また、葉肉細胞葉緑体におけるデンプン粒の出現状況はトウモロコシの類縁について考察する上での有効な指標となると考えられる。

トウモロコシの葉肉細胞葉緑体に全くデンプン粒が見られないということはない。葉の成長過程や温度条件によってはかなり明確なデンプンの蓄積が生じ、デンプン粒が出現する^{4,18,19}。また、デンプンの合成酵素と分解酵素は共に葉肉細胞にも存在しているが、合成酵素活性は、維管束鞘細胞で著しく高く^{19,20}分解酵素の活性は葉肉細胞で高いことが知られている²⁰。おそらく、両細胞におけるこれらの酵素の活性化の違いもまたトウモロコシとその類縁種との相関を示す指標となりうると思われるので、活性に関する細胞化学的研究が今後の課題として興味深い。

謝辞

本研究を行うにあたり、研究材料のトリプサカムの株とテオシントの種子をご提供下さいました京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻 栽培植物起源学分野の河原太八博士に感謝致します。また、河原太八博士をご紹介下さいました神奈川大学工学部の大塚一郎博士に謝意を表します。

文献

- 1) Laetsch WM (1971) Chloroplast structural relationships in leaves of C_4 plants. In: *Photosynthesis and Photorespiration*. Hatch MD, Osmond GB and Slatyer RO, eds., Wiley-Interscience, New York. pp. 323-349.
- 2) Kanai R and Edwards GE. (1999) The biochemistry of C_4 photosynthesis. In: *C_4 Plant Biology*. Sage RF and Monson RK, eds., Academic Press, San Diego. pp. 49-87.
- 3) Laetsch WM and Price I (1969) Development of dimorphic chloroplast of sugar cane. *Amer. J. Bot.* **56**: 77-87.
- 4) Suzuki S and Ueda R (1974) Electron microscope studies on the morphogenesis of plastids in C_4 plants. I. The relationship between development of plastids and leaf cell differentiation during germination in

- Zea mays* L.. *Sci Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku* **15**: 237-354.
- 5) Dengler NG and Nelson T (1999) Leaf structure and development in C₄ plants. In: *C₄ Plant Biology*. Sage RF and Monson RK, eds., Academic Press, San Diego. pp. 133-172.
 - 6) Sage RF, Li M and Monson RK (1999) The taxonomic distribution of C₄ photosynthesis. In: *C₄ Plant Biology*. Sage RF and Monson RK, eds., Academic Press, San Diego. pp. 551-584.
 - 7) Peachey LD (1965) The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol.* **25**: 209-231.
 - 8) Suzuki S, Nagayoshi H, Ishino K, Hino N and Sugi H (2003) Ultrastructural organization of the transverse tubules and the sarcoplasmic reticulum in a fish sound-producing muscle. *J. Electron Microsc.* **52**: 337-347.
 - 9) Aoki Y, Marumo S, Nishikata H, Kozuka M, Fukada M, Koura N, Hayatsu M and Suzuki S (2015) Ultrastructural changes and intracellular ion movements in tertiary pulvinous cells during the seismonastic response of *Mimosa pudica* L.. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 53-69.
 - 10) Ito S, Ono M, Hirose Y, Watanabe N, Utagawa C, Maeda N, Marumo S, Shimozone N, Shiozawa T, Ito S, Hayatsu M and Suzuki S (2018) Structural changes and intra- and extra-cellular ion movements in motor cells during leaf closure of insectivorous Venus flytrap. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **29**: 55-63.
 - 11) Kashiwagi M, Yoshida K, Sakai M, Hamamoto C and Suzuki S (1939) Morphogenesis of chloroplasts during the illumination in etiolated cotyledons of a C₄ plant *Amaranthus*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **19**: 57-65.
 - 12) Beadle GW (1939) Teosinte and the origin of maize. *J. Heredity* **30**: 245-247.
 - 13) Iltis HH (1939) From teosinte to maize: The catastrophic sexual transmutation. *Science* **222**: 886-894.
 - 14) Mangelsdorf PC and Reeves RG (1938) The origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **24**: 303-312.
 - 15) Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez GJ and Doebley J (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 6080-6084.
 - 16) Matsuoka Y (2005) Origin matters: Lessons from the search for the wild ancestor of maize. *Science* **55**: 383-390.
 - 17) 福永健二 (2009) トウモロコシの起源 —テオシント説と栽培化に関わる遺伝子—. *国立民俗学博物館調査報告書* **84**: 137-151.
 - 18) Hilliard JH and West SH (1970) Starch accumulation associated with growth reduction at low temperatures in a tropical plant. *Science* **168**: 494-496.
 - 19) Downton WJS and Hawker JS (1973) Enzymes of starch and sucrose metabolism in *Zea mays* leaves. *Phytochemistry* **12**: 1551-1556.
 - 20) Spillat SR and Preiss J (1987) Regulation of starch synthesis in the bundle sheath and mesophyll of *Zea mays* L. Intercellular compartmentation of enzymes of starch metabolism and the properties of the ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* **83**: 621-627.